

DESARROLLO DE SISTEMAS BIOPOLIMÉRICOS PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE DOXORUBICINA: ELECCIÓN DE LA MATRIZ Y ENSAYOS DE LIBERACIÓN

Trabajo de Tesis de Licenciatura en Biotecnología y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata



Victoria Alejandra Machain

El presente trabajo ha sido
realizado en el
Centro de Investigación
Y Desarrollo en Fermentaciones
Industriales y Biotecnología
(CINDEFI),
CONICET-UNLP

bajo la dirección del
Dr. Guillermo R. Castro

Agradecimientos

- A mi mamá y mi papá, por todo su amor, enseñanza, paciencia y apoyo.
- A mi familia, por su cariño y contención.
- A Guillermo, por sus consejos, enseñanzas y su gran predisposición en todo momento.
- A los chicos del laboratorio: Valeria, Yanina, Germán y Maximiliano, por ayudarme cuando lo necesité, por charlas y momentos compartidos.
- A Edgardo Donati, por abrirme las puertas del CINDEFI.
- A la Facultad de Ciencias Exactas (a todos los profesores que he tenido), por el conocimiento brindado.
- A Cristian y Agustina, por su amor y su paciencia.
- A todos los compañeros/amigos de la facu, por su ayuda y horas de estudio compartidas.
- Al jurado, Alba Navarro, Alan Talevi y Mariano Pistorio, por su buena predisposición para la lectura y evaluación de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

CAPITULO 1

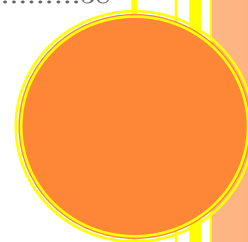
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Biopolímeros como matrices.....	2
1.2 Biopolímeros ensayados.....	3
1.2.1 Alginato.....	3
1.2.2 Carragenina.....	4
1.2.3 Gelatina.....	5
1.2.4 Gomas vegetales.....	6
1.2.5 Pectina.....	7
1.3 Antraciclinas: Doxorubicina.....	9
1.4 Reología.....	12
1.5 Liberación controlada de fármacos.....	14
OBJETIVOS.....	16

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Materiales.....	19
2.2 Procedimiento experimental.....	19
2.2.1 Curvas de calibración y preparación de soluciones estándar de doxorubicina.....	19
2.2.2 Preparación de soluciones de los diferentes biopolímeros.....	20
2.2.3 Determinación de la interacción con biopolímeros por precipitación con solventes.....	20
2.2.4 Formulación de matrices por gelificación iónica de los biopolímeros.....	21
2.2.5 Soluciones buffer utilizadas.....	22
2.2.6 Microscopía óptica.....	22
2.2.7 Maduración de las esferas.....	22
2.2.8 Estudios reológicos.....	22
2.2.9 Estudios vibracionales: Espectroscopía IR.....	23
2.2.10 Ensayos de liberación.....	23
2.2.11 Ensayos de capacidad máxima de carga de PEC 55-Dox.....	24

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1 Determinación de la interacción entre Dox y diferentes biopolímeros.....	26
3.2 Determinación de la interacción entre doxorubicina-pectinas.....	27
3.3 Gelificación iónica de doxorubicina-pectinas.....	28
3.4 Estudios reológicos.....	29
3.5 Estudios vibracionales: Espectroscopía IR.....	33
3.6 Ensayos de liberación.....	35
3.7 Capacidad de carga máxima de la PEC 55.....	36
3.8 Estudios de almacenamiento y posterior liberación de Dox.....	37
3.9 Estudios de liberaciones en condiciones simuladas.....	38



CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES.....	42
Conclusiones.....	43

ANEXOS

ANEXOS.....	45
A1 Curvas de calibración.....	46
A2.Test T para determinación de diferencias significativas entre muestras independientes...48	
A2.1 Prueba entre PEC 33 y CAR.....	49
A2.2 Prueba entre PEC 35 y PEC 33.....	50
A2.3 Prueba entre PEC 35 y PEC 55.....	50
A2.4 Prueba entre PEC 67 y PEC 55.....	51
A2.5 Prueba entre PEC 74 y PEC 67.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Figura 1: Formación de la estructura de gel en alginatos y la ubicación de los iones polivalentes entrecruzantes.....	3
Figura 2: Carragenina tipo kappa.....	4
Figura 3: Estructura amorfa de las cadenas moleculares de gelatina, con uniones rígidas tipo colágeno.....	5
Figura 4: Transformación de semillas de algarrobo para obtener la goma garrofín.....	6
Figura 5: Moléculas de pectina de alto y bajo metoxilo.....	8
Figura 6: Estructura de la doxorrubicina.....	9
Figura 7: Diagrama que muestra dos moléculas de Dox intercalándose en el ADN.....	10
Figura 8: Esquema de dos capas de fluido en movimiento.....	12
Figura 9: Curvas de flujo y viscosidad de un líquido newtoniano.....	12
Figura 10: Curvas del esfuerzo de corte en relación a la tasa de corte al ir aumentando e ir disminuyendo la tasa de corte.....	13
Figura 11: Dependencia del esfuerzo de corte (izquierda) y la viscosidad (derecha) respecto de la tasa de corte para un fluido pseudoplástico.....	13
Figura 12: Sistemas tradicionales de liberación y sistemas de liberación controlada de fármacos.....	14

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 13: Unión de Dox en función de los diferentes grados de metoxilación de las pectinas ensayadas luego de 2 hs de incubación.....	28
Figura 14: Microscopía óptica para partículas de PEC 55 con o sin carga de Dox y de fluorescencia para una partícula cargada.....	29
Figura 15: Comportamiento de flujo para PEC y PEC-Dox. Tensión de corte en función de la velocidad de deformación.....	31
Figura 16. Comportamiento de flujo para PEC y PEC-Dox. Viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación.....	32

Figura 17: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 en el tiempo contra buffer HEPES pH = 7,4 a 25 °C.....	35
Figura 18: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 55 en el tiempo contra buffer HEPES pH = 7,4 a 25 °C.....	36
Figura 19: Carga máxima de la PEC 55 con Dox.....	37
Figura 20: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 55 luego de 12 meses almacenadas a 5 °C.....	38
Figura 21: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 y PEC 55 en el tiempo contra buffer Clark and Lubs a 37 °C.....	39
Figura 22: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 y PEC 55 en el tiempo contra buffer fosfato a 37 °C.....	39
Figura 23: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 y PEC 55 en el tiempo contra buffer fosfato a 25 °C.....	40
Figura 24: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 y PEC 55 en el tiempo contra buffer HEPES a 37 °C.....	41

ANEXO

Figura A1.1: Curva de calibración de Dox en acetona.....	46
Figura A1.2: Curva de calibración de Dox en NaCl 0,9 % pH=3.00.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Concentraciones de soluciones stock de biopolímeros empleados.....	20
---	----

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Precipitación del complejo Dox/biopolímero luego de 15 min y 2 hs de incubación.....	26
Tabla 3: Precipitación Dox/pectina luego de 15 min y 2 hs de incubación.....	27
Tabla 4: Características reológicas de PEC 35 y PEC 55 con y sin Dox.....	33
Tabla 5: Bandas espectroscópicas encontradas en análisis FTIR (cm ⁻¹) y sus asignaciones para: Dox pura, PEC 55 (en estado sólido) y la formulación PEC 55-Dox a pH= 7,4.....	34

ANEXO

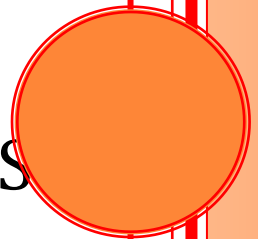
Tabla A1.1: Concentración de Dox en acetona vs intensidad determinada por fluorescencia....	46
Tabla A1.2: Concentración de Dox en NaCl 0,9 % pH=3.00 vs intensidad determinada por fluorescencia.....	47
Tabla A2.1: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 33 y CAR.....	49
Tabla A2.1: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 35 y PEC 33.....	50
Tabla A2.2: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 35 y PEC 55.....	50
Tabla A2.3: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 67 y PEC 55.....	51
Tabla A2.4: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 74 y PEC 67.....	52

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Y

OBJETIVOS



1.1 Biopolímeros como matrices:

Los biopolímeros son compuestos producidos por organismos vivos. Contienen unidades monoméricas orgánicas unidas covalentemente y pueden reaccionar para producir moléculas de elevado peso molecular.

Alrededor de 1950 comenzaron a utilizarse los biopolímeros en medicina con amplias y variadas aplicaciones como dispositivos terapéuticos cardiovasculares, en tejidos blandos, odontología, ortopedia y sistemas de liberación controlada de fármacos, entre otras.

El desarrollo y descubrimiento de nuevos biopolímeros, así como las nuevas tecnologías de síntesis, purificación y modificación, han permitido grandes avances en la liberación modificada de principios activos, localización a dianas farmacológicas, sobrepaso de barreras fisiológicas, protección de principios activos frente a condiciones fisiológicas, entre otros.

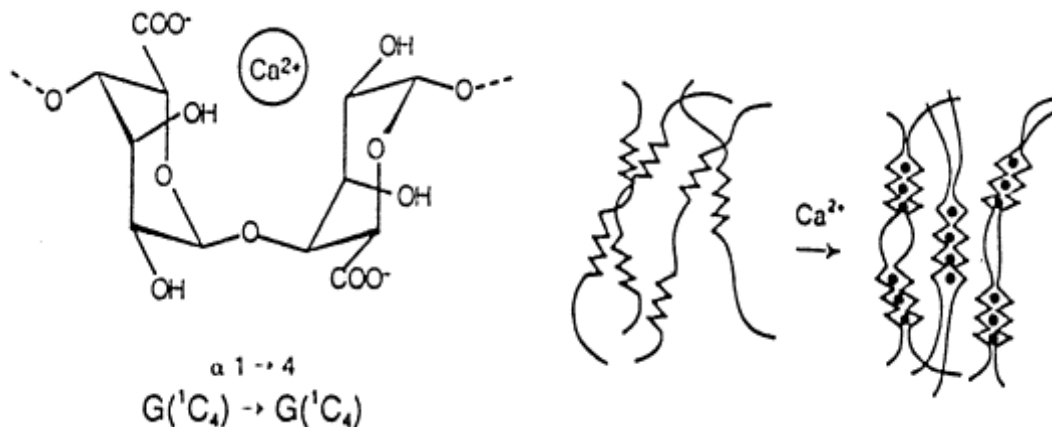
Las ventajas de usar biopolímeros para liberación controlada de fármacos comparado con el de polímeros sintéticos es que no presentan problemas de biocompatibilidad, en general no son inmunogénicos y no presentan toxicidad. Entre otras propiedades se debe tener en cuenta la respuesta de muchos biopolímeros a los estímulos ambientales como cambios de temperatura, pH, agentes químicos, sales, tensión mecánica, sustratos de enzimas, entre otros.

1.2 Biopolímeros a ensayar

1.2.1 Alginato

Es un biopolímero lineal compuesto de ácido β -manurónico (denominada unidad M) y ácido α -gulurónico (denominada unidad G) unidos por enlaces 1-4. Presenta una alta estabilidad y resistencia mecánica. El alginato puede ser obtenido de algas y de algunas especies microbianas, y su importancia tecnológica radica en su capacidad para formar hidrogeles. Es uno de los geles biopoliméricos más usados en industrias de alimentos, farmacéuticas y de salud humana (Dornish *et al.*, 2001). El alginato es un hidrogel que posee la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y, en presencia de iones multivalentes (*e.g.* calcio, zinc y otros) es capaz de formar geles poliméricos, proceso que se denomina *gelación iónica*. En el caso del alginato, la red polimérica está compuesta de moléculas lineales conectadas entre sí por interacciones iónicas dando lugar a entrecruzamientos denominados comúnmente “caja de huevos” (*egg shell*).

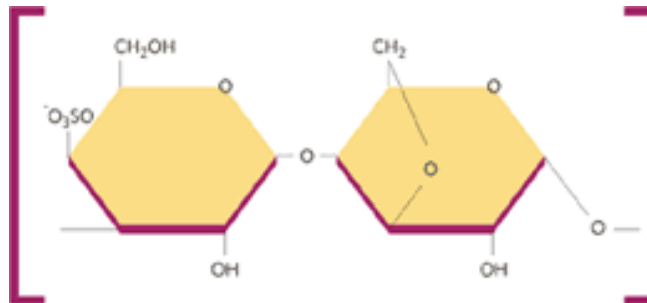
Figura 1: Formación de la estructura que es análoga a la forma de caja de huevo y la ubicación de los iones polivalentes que sirven de enlace de dos moléculas de alginato.



1.2.2 Carragenina

Las carrageninas son hidrocoloides extraídos de algas marinas rojas y es utilizado en diversas aplicaciones en la industria alimentaria como espesante, gelificante, agente de suspensión y estabilizante. Puede ser utilizada, también, como agente de suspensión, retención de agua, gelificación, emulsificación y estabilización en otras diversas aplicaciones industriales. Es clasificada de acuerdo con su estructura y propiedades físico-químicas o según su proceso de producción: *Kappa*, *Iota* o *Lambda* (Porto, 2003).

Figura 2: Carragenina tipo kappa.

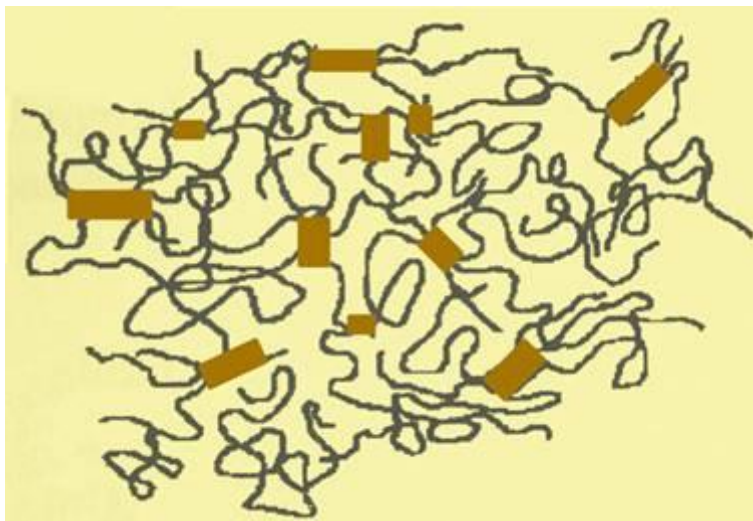


1.2.3 Gelatina

La gelatina es una mezcla de diversas macromoléculas con características coloidales, incolora, translúcida, quebradiza e insípida, que se obtiene a partir del colágeno procedente del tejido conectivo de animales obtenido mediante extracción con agua en ebullición.

La gelatina es una proteína compleja compuesta por: 84-90% proteína proveniente de colágeno desnaturalizado, 1-2% sales minerales y el porcentaje restante es agua. El grado de polimerización, la naturaleza de los monómeros y la secuencia en la cadena proteica determinan sus propiedades generales. Una notable propiedad de las disoluciones de esta molécula es su comportamiento frente a temperaturas diferentes: son líquidas en agua caliente y gelifican en agua fría.

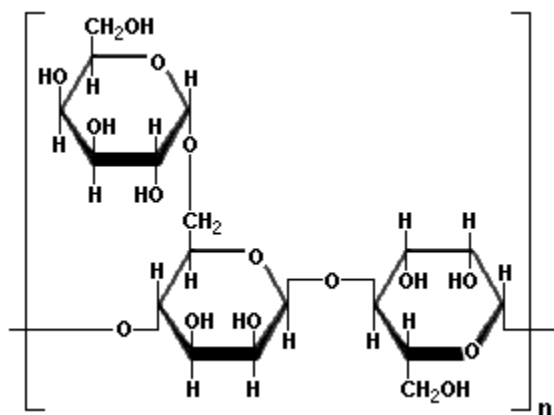
Figura 3: Estructura amorfa de las cadenas moleculares de gelatina, con uniones rígidas tipo colágeno.



1.2.4 Gomas vegetales

Son polisacáridos que consisten en cadenas poliméricas de manosa que poseen grupos laterales de galactosa (galactomananos). Las unidades de manopiranosas están unidas por enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$, y las unidades laterales de galactopiranosas se unen a la cadena central con enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$. Las características y propiedades de cada goma son dependientes de la fuente vegetal y de su procesamiento. Son utilizadas comúnmente como agentes viscosantes de productos alimenticios. Para las diferentes gomas varía la relación entre las moléculas de manosa y galactosa. La goma guar posee cinco u ocho veces más capacidad espesante que el almidón, y es por ello que ha sido ampliamente usada en la industria farmacéutica, y como estabilizante de productos alimenticios (Berner-Strzelczyk *et al.*, 2006; Chavda *et al.*, 2012).

Figura 4: El guaran es el polisacárido principal de la goma guar.



1.2.5 Pectina

Las pectinas son una mezcla de polímeros ácidos y neutros ramificados. Constituyen el 30 % del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales. En presencia de agua forman geles.

Las pectinas tienen tres dominios principales: homogalacturonanos, ramnogalacturonanos tipo I y II.

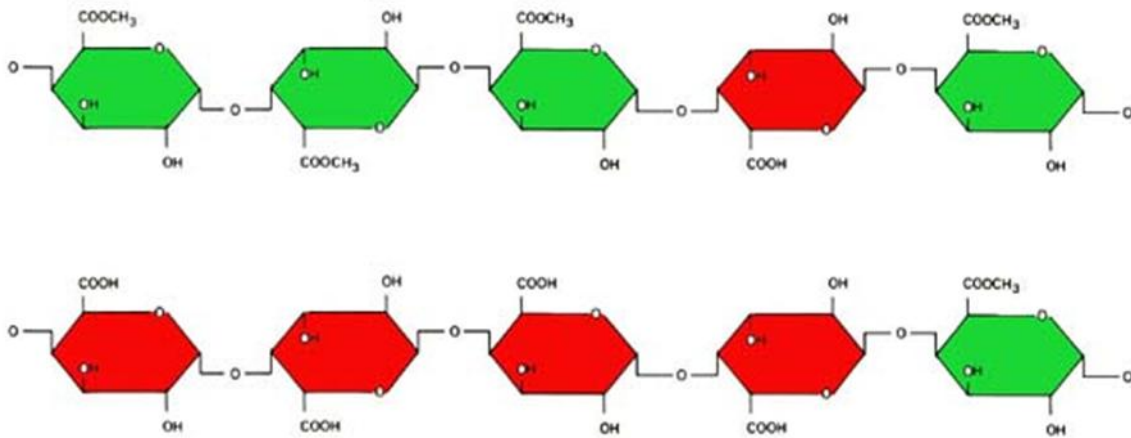
Homogalacturonanos: compuestos por residuos de ácido D-galacturónico (GalU) unidos por un enlace $\alpha(1 \rightarrow 4)$. Los grupos carboxilo del C6 (carbono número 6 del GalU) pueden estar metil-esterificados o no. Los grupos carboxilo libres, si están disociados, pueden establecer uniones iónicas con iones divalentes entre cadenas de HG vecinas, pero no son capaces de formar la denominada estructura en caja de huevos como en caso del alginato.

Ramnogalacturonano I: GalU enlazado en $\alpha(1-4)$ con restos de L-ramnosa (Rha) intercalados con un enlace $\alpha(1-2)$; es decir: $[(1-2)-\alpha\text{-L-Rha-(1-4)-}\alpha\text{-D-GalU}]_n$, donde n puede ser mayor de 100. Las ramnosas pueden estar unidas a su vez a galactosa o arabinosa.

Ramnogalacturonano II: Polisacárido pequeño, de estructura muy compleja; formado por GalU, Rha, Ara, Gal y pequeñas cantidades de azúcares poco frecuentes como apiosa, o ácido acérico.

En función del porcentaje de restos de ácido galacturónico esterificado, las pectinas se clasifican como "de alto metoxilo", cuando este porcentaje es superior al 60%, "de bajo metoxilo", cuando es inferior a 40 % y de grado intermedio cuando el grado de metoxilación está comprendido entre 40 a 60 %.

Figura 5: Moléculas de pectina de alto (arriba) y bajo (abajo) grado de metoxilación .

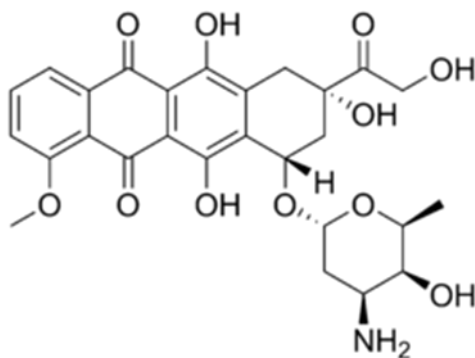


Las pectinas de alto y medio o bajo grado de metoxilación difieren en las condiciones de gelificación. Las pectinas de alto metoxilo gelifican a pHs bajos para evitar la repulsión aniónica de los grupos carboxilato (debajo del pKa de los iones carboxilato) y en presencia de agentes osmóticamente activos (e.g. sacarosa). En cambio, las de bajo y medio grado de metoxilación forman geles por gelación iónica, la cual consiste en que cationes multivalentes (generalmente Ca⁺²) reaccionan con las cargas negativas de los grupos ácidos ionizados (Durand *et al.*, 1990).

1.3 Doxorrubicina

La doxorrubicina (Dox) es una droga antitumoral que pertenece al grupo de las antraciclinas, las cuales son usadas principalmente en enfermedades hematológicas y tumores sólidos.

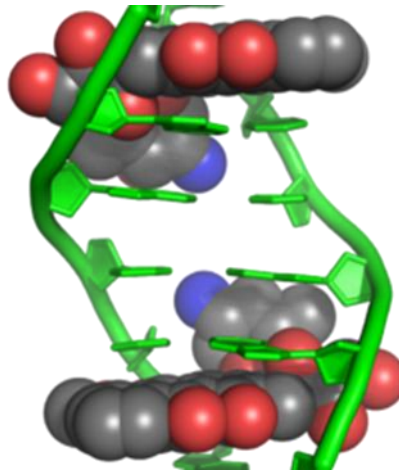
Figura 6: Estructura de la doxorrubicina ((8S,10S)-10-(4-amino-5-hidroxi-6-metil-tetrahidro-2H-pirano-2-iloxi)-6,8,11-trihidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-1-metoxi-7,8,9,10-tetrahidrotetraceno-5,12-diona).



La Dox bloquea la síntesis de ARN y ADN. Las células en fase S son más sensibles a éste agente debido a que en esta fase se sintetiza el ADN de la célula hija y cuando la Dox se une la célula no puede continuar el ciclo celular y dividirse. Tiene dos mecanismos principales, por los que causa muerte celular:

- **Intercalación:** La doxorrubicina se intercala entre nucleótidos adyacentes a lo largo del ADN formando una interacción fuerte entre el fármaco y el ADN. Esta interacción inhibe la síntesis y la transcripción del ADN.

Figura 7: Diagrama que muestra dos moléculas de Dox intercalándose en el ADN.



- Inhibición enzimática: La doxorubicina se une e inhibe a la topoisomerasa tipo II, una enzima clave de la síntesis del ADN que está encargada de separar las dos hebras (Tewey *et al.*, 1984).

El metabolismo de ésta molécula también genera radicales libres de oxígeno que causan daño al ADN y previene su síntesis (Gajewski *et al.*, 2007). Este proceso ocurre porque la Dox acepta un electrón de enzimas redox (*e.g.* reductasas) para dar lugar a radicales libres. Éstos transfieren el electrón al oxígeno molecular, que se convierte en un anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Estos aniones son reactivos e inestables, convirtiéndose en presencia de agua en radicales hidroxilo, especie química más reactiva y más tóxica (Doroshov, 1983). También se forman especies reactivas del oxígeno cuando la Dox interacciona con el hierro (reacción de Fenton) (Xu *et al.*, 2005).

La vía de administración de la Dox es generalmente intravenosa y se elimina por las vías biliar y fecal. Sin embargo, para que el fármaco actúe en las células blanco la concentración en sangre debe ser muy elevada debido a su alta dispersión, lo que produce severos efectos secundarios. Entre ellos náuseas, vómitos y arritmias, así como neutropenia (descenso en el número de leucocitos), alopecia completa, mielosupresión (anemia, etc.), supresión

inmune (aumentando el riesgo de infección), etc. La cardiotoxicidad por Dox es dosis-dependiente y se caracteriza por un descenso del número de mitocondrias y menor cantidad de oxidación fosforilativa. Las especies reactivas de oxígeno pueden dañar los miocitos (células cardíacas) más que a otros tejidos porque tienen menos enzimas que los inactiven (Doroshov *et al.*, 1980). La liberación controlada de Dox implica el uso de menores dosis por períodos más prolongados lo que posibilitaría poseer una mayor acción anticancerígena, disminuyendo sus efectos secundarios.

1.4 Reología

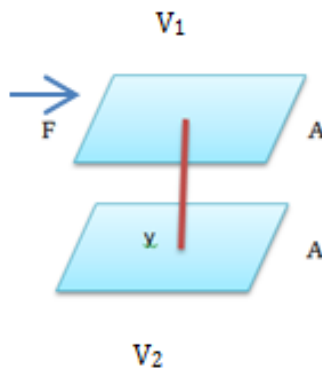
La reología es la rama de la física que estudia la relación entre el esfuerzo y la deformación en los materiales que son capaces de fluir.

A los líquidos se les aplica la ley de Newton:

$$\tau = \eta \cdot \gamma$$

Donde τ es el esfuerzo aplicado (esfuerzo de corte), η es la resistencia del fluido a deformarse (viscosidad) y γ es la tasa de corte (o velocidad de deformación).

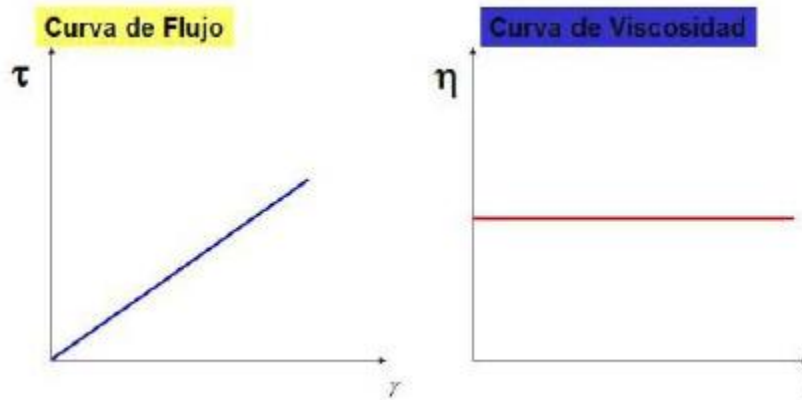
Figura 8: Esquema de dos capas de fluido en movimiento.



A su vez, el esfuerzo de corte es: $\tau = F/A$ y la tasa de corte: $\gamma = dv/dy = V_2 - V_1/y$.

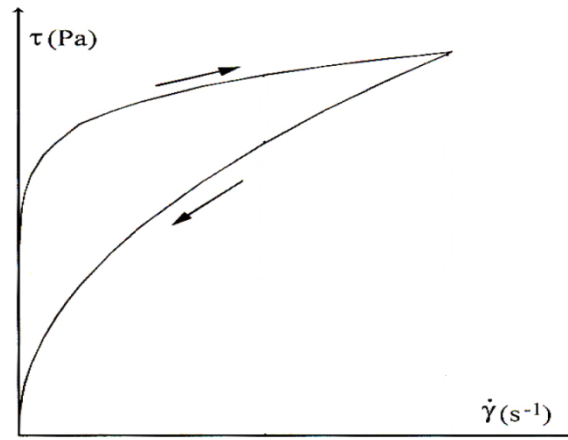
Para los fluidos newtonianos la relación entre el esfuerzo de corte y la tasa de corte es lineal debido a que la viscosidad es continua independiente del esfuerzo de corte al cual se somete al fluido.

Figura 9: Curvas de flujo y viscosidad de un líquido newtoniano.



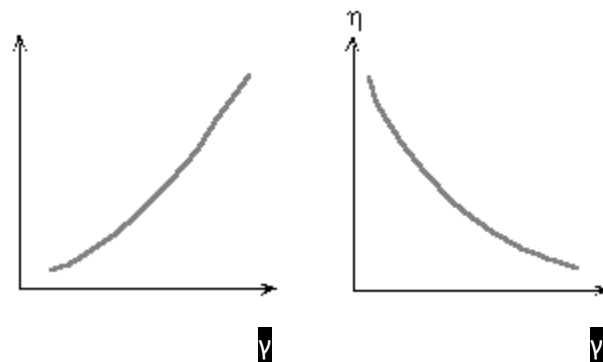
Tixotropía: fluidos que sufren un cambio estructural al aplicarle un esfuerzo cortante (ruptura de las cadenas macromoleculares). La viscosidad va disminuyendo al aplicar un esfuerzo. Recuperan la viscosidad inicial tras un tiempo de reposo.

Figura 10: Curvas del esfuerzo de corte en relación a la tasa de corte al ir aumentando (curva superior) e ir disminuyendo (curva inferior) la tasa de corte.



Fluido pseudoplástico: fluido cuya viscosidad disminuye a medida que aumenta el esfuerzo de corte sobre el mismo.

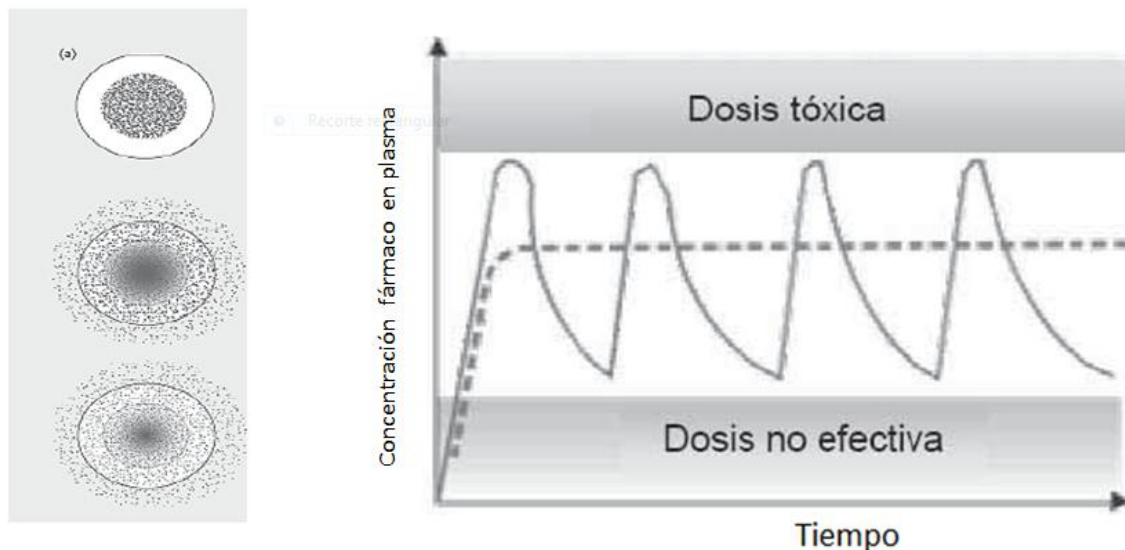
Figura 11: Dependencia del esfuerzo de corte (izquierda) y la viscosidad (derecha) respecto de la tasa de corte para un fluido pseudoplástico.



1.5 Liberación controlada de fármacos:

El interés de la liberación de fármacos a través de transportadores específicamente diseñados se ha incrementado considerablemente durante los últimos años. Porque el transportador posee el potencial para dirigir la droga a su sitio de acción y obtener así un efecto farmacológico óptimo y al mismo tiempo reducir los efectos adversos de la droga. A su vez, se puede controlar la velocidad con la que se libera la droga, así facilitar una dosis óptima y reducir la duración del tratamiento. Se han estudiado aplicaciones de los sistemas de liberación controlada en diversas terapias donde el agente bioactivo fueron medicamentos contra el cáncer, agentes antiinflamatorios, factores de crecimiento y anticonceptivos, entre otros (Sukukara *et al.*, 1992; Karunakar and Wahi, 1995; Leroueil-Le Verger *et al.*, 1998; Teupe *et al.*, 1992). Entre las matrices que pueden emplearse para estos fines existe una amplia gama de polímeros degradables, de origen natural y sintético que pueden ser utilizados.

Figura 12: Sistemas tradicionales de liberación (línea continua) y sistemas de liberación controlada de fármacos (línea discontinua).



Debido a que la biodegradación del biopolímero generalmente involucra dos mecanismos pasivos gobernados por los factores ambientales y que pueden actuar simultáneamente, a saber:

1. La erosión de la masa del transportador, que implica un proceso físico de degradación mediado por fuerzas de rozamiento (*e.g.* efecto de corte),
2. La biodegradación, que involucra en una primera etapa un proceso de solvatación de los polímeros contenidos en la micropartícula, y posteriormente un cambio de fase de los componentes de la matriz que conduce a proceso de degradación de la matriz y su disolución en el medio. Después que la hidratación de la matriz del biopolímero ha ocurrido, la molécula de principio activo encapsulado comienza a disolverse en el medio acuoso y difunde fuera de la matriz del biopolímero, por lo tanto, el mecanismo de liberación de principios activos puede verse como en 3 etapas:
 1. Una liberación inicial del principio activo adsorbido en la superficie o en la región superficial de la micropartícula.
 2. Liberación difusional del principio activo a través de la matriz del biopolímero y a través de los poros durante la degradación de la matriz.
 3. Liberación erosional del principio activo por la desintegración de la matriz del biopolímero y disolución después que la matriz pierde su integridad y las cadenas del polímero son degradadas a un tamaño lo suficientemente pequeñas como para ser solubilizadas.

Todas estas etapas pueden desempeñar una parte importante en el proceso de liberación, lo que depende de la naturaleza del principio activo encapsulado, las propiedades fisicoquímicas del polímero y la estructura de la micropartícula.

OBJETIVOS

Los métodos de liberación controlada y sostenida de moléculas constituyen una nueva estrategia de desarrollo en la industria farmacéutica que permite reducir dosis, frecuencias de administración y toxicidad de fármacos cuyas dosis terapéuticas presentan elevada toxicidad y/o importantes efectos secundarios. Este es el caso de fármacos utilizados para tratamientos de cáncer, cuya administración apropiada sigue presentando hoy en día un desafío para la industria farmacéutica y la medicina.

En el presente trabajo se postula desarrollar vehículos más eficientes para el transporte y liberación de moléculas de interés biológico de uso humano y altamente tóxicas empleadas en el tratamiento de patologías agudas y crónicas.

Se propone el empleo de biopolímeros naturales para su utilización como matrices transportadoras y el estudio de pruebas de concepto a escala de laboratorio, con la finalidad de una potencial aplicación en el ámbito farmacéutico.

Se realizarán estudios con un fármaco seleccionado, Doxorrubicina, una molécula de uso anticancerígeno perteneciente a la familia de las antraciclinas con elevada toxicidad, y de amplio uso en tratamientos oncológicos, para desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos.

Se trabajará sobre diferentes polímeros biológicos naturales, como: alginatos (producidos por algas), pectinas y gomas con el objeto de desarrollar matrices capaces de contener el fármaco modelo.

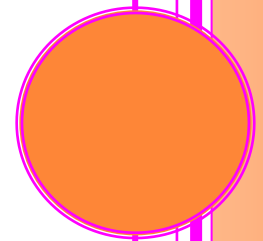
Se explorará el desarrollo de microesferas generadas por gelación iónica en diferentes condiciones de trabajo.

Se caracterizarán y evaluarán sistemas seleccionados, empleándose técnicas de microscopía, espectroscopía vibracional (FTIR y RAMAN) y análisis reológicos. Se analizarán las capacidades de almacenamiento y condiciones de

entrecruzamiento, estabilidades en medios simulados al fluido gástrico e intestinal así como las cinéticas de liberación bajo estas condiciones.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y METODOS



2.1. Materiales:

Los materiales empleados fueron: doxorubicina (Dox, clorhidrato de Doxorubicina, $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$, peso molecular: 579.98 g/mol, grado de pureza HPLC) generosamente provista por Laboratorio LKM, pectina citrus (74 % metoxilación) (Sigma-Aldrich) y carragenina kappa (CAR) (Saporiti hnos). Además se emplearon: sal sódica de alginato (ALG, de baja viscosidad, peso molecular viscosímetro promedio: 1×10^5 Da) adquirida a Biochem (SA), gelatina (GELA) adquirida a PARAFARM, goma arábica (GARAB) adquirida a DROAN, goma guar (GG) provista generosamente por Nutrial (Buenos Aires, Argentina). La goma guar fue provista por Hindustan Gums & Chemicals (India) y derivatizada: carboximetilada (CMGG) en el laboratorio del Prof. Arup Mukherjee (Univ de Calcuta, Kolkata, India). La goma garrofín (GGARR) provista por Saporiti hnos (Buenos Aires, Argentina). Las pectinas de 33,0, 35,4, 55,3 y 67,2 % (PEC 33, PEC 35, PEC 55 y PEC 67 según sus grados de metoxilación) fueron gentilmente provistas por CPKelco (Dinamarca). Todos los restantes reactivos fueron de grado analítico o superior de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.) o Merk (Darmstadt, Alemania).

2.2. Procedimiento experimental:

2.2.1 Curvas de calibración y preparación de soluciones estándar de doxorubicina

Se preparó una solución estándar de doxorubicina (Dox) en solución salina (NaCl 154 mM, pH= 3,0) y se realizaron diluciones en serie con el objeto de determinar la relación entre absorbancia y concentración. Las determinaciones cuantitativas de Dox se realizaron por fluorimetría. Se realizó un barrido espectral de soluciones de baja concentración de Dox para determinar por fluorescencia las longitudes de onda de máxima absorción de la solución de Dox patrón. Las determinaciones se realizaron a $\lambda_{exc} = 454$ nm y

λ_{em} = 588 nm. Se analizó el intervalo de linealidad de las mismas y se calculó el coeficiente de correlación (r) para determinar el ajuste de la regresión lineal.

2.2.2 Preparación de soluciones de los diferentes biopolímeros:

Se pesó una cantidad requerida de cada biopolímero para obtener soluciones acuosas de concentraciones comprendidas en el intervalo entre 0,5 a 2,0 % (p/v) (Tabla 1). Se les agregó azida de sodio (0,01 %) para evitar posible degradación bacteriana de las mismas y se las almacenó a 5 °C hasta su utilización.

Tabla 1: Concentraciones de soluciones stock de biopolímeros empleados en el presente trabajo.

Biopolímeros	Concentración (% p/v)
Alginato de sodio (ALG)	1,5
Gelatina (GELA)	2,0
Pectina (PEC)	1,5
Carragenina (CAR)	1,0
Goma arábica (GARAB)	0,5
Goma guar (GG)	0,5
Goma garrofín (GGARR)	0,5

2.2.3 Soluciones buffer utilizadas:

Para la encapsulación de la doxorrubicina se empleó buffer (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) Tris-HCl, 100 mM a pH= 8,9.

Para la solución de pectinas se utilizó buffer (3-morfolinopropano-1-ácido sulfónico) MOPS, 50 Mm, pH= 7,0.

Para las cinéticas de liberación de doxorrubicina se utilizaron soluciones de buffer HCl-KCl (Clark & Lubs) 50 mM, pH= 2,0; buffer (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetanolsulfónico) HEPES 50 mM, pH= 7,4 y buffer fosfato salino (PBS) a pH= 7,4.

2.2.4 Determinación de la interacción de Dox con biopolímeros por precipitación con solvente:

Con diferentes biopolímeros:

Se incubaron 375 µl de soluciones de biopolímero con 125 µl de solución de Dox (dilución 1/10 de la solución *stock*) durante 15 minutos (Grupo A) o 2 horas (Grupo B) a 25 °C. Luego del tiempo de incubación para cada grupo de muestras, se agregaron 1,0 ml de acetona (0°C) y se centrifugó a 10.000 xg durante 5 minutos y se separó el sobrenadante. Posteriormente se determinó la concentración de Dox en todos los sobrenadantes mediante espectrofluorimetría como se mencionara anteriormente.

Con diferentes pectinas:

Pectinas de diversos grados de metoxilación fueron pesadas y disueltas para preparar soluciones acuosas de pH regulado (buffer MOPS, 50 mM, pH= 7,0) al 2,0 % (p/v). Posteriormente se les adicionó un volumen de solución patrón de Dox, de forma tal que la concentración final de los sistemas sea 300 µM. Se incubaron las soluciones por 2 horas con agitación (500 rpm) a temperatura ambiente (25 °C) y se procedió como se detalló para el resto de los polímeros.

2.2.5 Formulación de matrices por gelificación iónica de los biopolímeros:

Se gotearon 2,0 ml de una solución de pectina/Dox, sobre 25,0 ml de una solución de CaCl_2 (250 mM, preparada en buffer Tris-HCl, 100 mM pH= 8,9) y glicerol al 50 %, durante el lapso de 20 minutos con agitación suave (100 rpm) en baño de hielo (0 °C). Las microesferas fueron filtradas utilizando una placa filtrante de porcelana cubierta con papel de filtro (Whatman #1). Posteriormente, se determinó por fluorescencia la concentración de Dox en el filtrado, con lo cual se cuantificó la cantidad de fármaco remanente luego del proceso de encapsulación.

2.2.6 Microscopía óptica:

Las observaciones se llevaron a cabo mediante un microscopio óptico con fuente UV adosada y filtros de fluorescencia (495-505 nm) marca Leica (modelo DM 2500, Alemania).

2.2.7 Maduración de las esferas

Posteriormente al filtrado, las microesferas fueron secadas con 3,0 ml de acetona (0 °C) durante una hora a temperatura ambiente. Se secaron bajo corriente de aire durante 12 horas y se almacenaron a 5 °C hasta su utilización.

2.2.8 Estudios reológicos

Para la caracterización reológica de los sistemas en solución de PEC y PEC-Dox se utilizó un reómetro de esfuerzo de corte controlado (Anton Paar MCR 301) con paralelo de 43 mm (PP43/GL-SN16497 *Measurements system*) y

un sistema accesorio P-PTD120-SN80470786. El rango utilizado fue de 0.7 mm. Para el estudio de los efectos de corte, se utilizaron velocidades de corte en el rango de 1 a 1000 s⁻¹. Todos los ensayos de reología fueron llevados a cabo a 37 °C y las curvas mostradas corresponden a los valores promedios de los cuadruplicados para cada medida. Los datos recolectados de tensión de corte, velocidad de corte, así como la viscosidad aparente fueron obtenidos directamente del instrumento.

2.2.9 Estudios vibracionales: Espectroscopía IR

Las formulaciones de PEC y PEC-Dox fueron analizadas mediante un equipo de FTIR (JASCO FTIR - 4200). Las pastillas fueron preparadas por la mezcla de cada muestra al 5,0 % (p/p) con bromuro de potasio (KBr, *Pike technologies*) y barridas con una corrección de fondo para 256 barridos, contra una fuente de alta energía de cerámica y un detector. Los espectros correspondientes a los análisis de FTIR para PEC y PEC-Dox fueron realizados para el intervalo de 4000 – 400 cm⁻¹ con 4 cm⁻¹ de resolución. Asimismo las formulaciones de Dox fueron analizadas por FTIR en la Línea SMIS del Sincrotrón SOLEIL (SMIS beamline, *Soleil, French National Synchrotron Facility*, Francia).

2.2.10 Ensayos de liberación

Se pesaron 200.0 mg de esferas deshidratadas en una balanza analítica (Adventurer OHAUS) de alta precisión (0.1 mg) y fueron colocadas en un frasco REACTI-VIAL de 4,0 ml de capacidad, con el agregado de 1,0 mililitro de solución buffer. La cinética de liberación de Dox fue realizada a temperatura ambiente (25 °C) y a 37 °C en buffer HEPES (pH = 7,4), en buffer Clark and Lubs

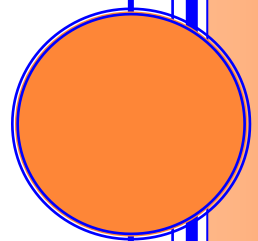
(pH= 2,0) o en buffer PBS (pH= 7,4) con una agitación de 500 rpm. A determinados intervalos de tiempo se tomó una muestra de 300 µl de la fase líquida y se repuso el volumen con medio fresco. A cada fracción extraída se le determinó la concentración de Dox liberada por espectrofluorimetría.

2.2.11 Ensayos de capacidad máxima de carga de PEC 55-Dox:

Se incubaron 375 µl de solución de 2.0 % (p/v) de pectina 55 % metoxilación con cantidades crecientes de solución stock de Dox y cantidad necesaria de solución de NaCl 0,9 %, pH= 3,0 hasta completar 125 µl entre ambas por 15 minutos. Luego se les agregó 1,0 ml de acetona y se las centrifugó a 10.000 xg durante 5 minutos. Posteriormente, se separó el sobrenadante determinándose la concentración de Dox por espectrofluorimetría.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION



3.1 Determinación de la interacción entre Dox y diferentes biopolímeros:

La concentración de Dox determinada por fluorescencia reveló diferencias en la interacción de los biopolímeros con Dox [Tabla 2].

Tabla 2: Precipitación del complejo Dox/biopolímero luego de 15 min y de 2 horas de incubación. (μg de Dox unida por gramo de masa de biopolímero)

Biopolímeros	Tiempo de incubación (minutos)			
	15		120	
	Dox/biopol ($\mu\text{g/g}$)	Unión (%)	Dox/biopol ($\mu\text{g/g}$)	Unión (%)
Alginato (ALG)	0,0	0,0	160,9 \pm 41,4	8,0
Carragenina (CAR)	648,5 \pm 93,7	21,6	722,9 \pm 96,2	24,1
Gelatina (GELA)	0,0	0,0	0,0	0,0
G. arábica (GARAB)	0,0	0,0	0,0	0,0
G. garrofín (GGARR)	0,0	0,0	0,0	0,0
G. guar H. (GG)	0,0	0,0	0,0	0,0
G. guar N. (CMGG)	0,0	0,0	0,0	0,0
Pectina 33% (PEC 33)	1.161,1 \pm 18,9	56,7	1.134,3 \pm 2,3	55,4

El error en las determinaciones fue estimado como la desviación estándar (σ).

Como puede observarse en la tabla 2 el polímero que presentó mayor porcentaje de unión a Dox fue la pectina 33 % de metoxilación. En menor medida la carragenina también presentó cierto grado de interacción (entre 50 y 60 % respecto de los valores hallados para la pectina ensayada).

Se realizó un test T entre la carragenina y la pectina 33% de metoxilación para corroborar que las diferencias en los grados de unión de Dox no se deben al azar y son significativas. Se encontró que eran significativas (Anexo 2).

A partir de estos resultados, se seleccionaron las pectinas con el objeto de determinar el grado de metoxilación que presentaba mayor afinidad por la droga.

Para ello, se extendió el procedimiento de selección a 5 pectinas de diferentes grados de metoxilación empleando el mismo procedimiento que para la selección que fuera previamente desarrollada. Los resultados son mostrados en la próxima sección.

3.2 Determinación de la interacción entre Dox y pectinas:

Con los resultados anteriores se decidió ensayar la interacción de Dox con cinco pectinas de diferente grado de metoxilación [Tabla 3].

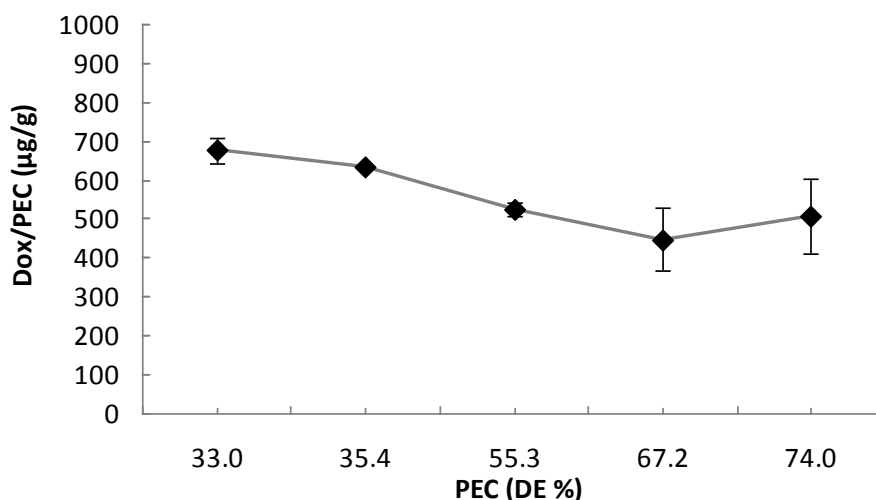
Tabla 3: Precipitación Dox/pectinas (1.5 %, P/V) luego de 15 min y 2 horas de incubación. (μg de Dox unida por gramo de masa de pectina).

Grado de metilación de Pectina (%)	Tiempo de incubación (minutos)			
	15		120	
	Dox/pectina ($\mu\text{g/g}$)	Unión (%)	Dox/pectina ($\mu\text{g/g}$)	Unión (%)
33,0	$332,5 \pm 75,4$	53,5	$664,2 \pm 32,3$	81,3
33,4	$385,2 \pm 38,2$	52,5	$634,9 \pm 3,6$	100,0
55,3	$380,1 \pm 49,5$	40,4	$530,8 \pm 18,6$	92,9
67,2	$420,4 \pm 62,8$	58,1	$474,6 \pm 81,0$	100,0
74,0	$492,9 \pm 64,6$	86,7	$473,2 \pm 95,2$	100,0

El error en la determinaciones fue estimado como la desviación estándar (σ).

Las diferencias entre los porcentajes de unión observados con el tiempo de incubación sugieren la presencia de un control de proceso de naturaleza cinética. Luego de 15 minutos, el proceso de interacción probablemente se encuentre aún en un equilibrio transiente, en donde la interacción es más favorable energéticamente que cinéticamente bajo nuestras condiciones experimentales.

Figura 13: Interacción de Dox en función de los diferentes grados de metoxilación de las pectinas ensayadas luego de 2 hs de incubación



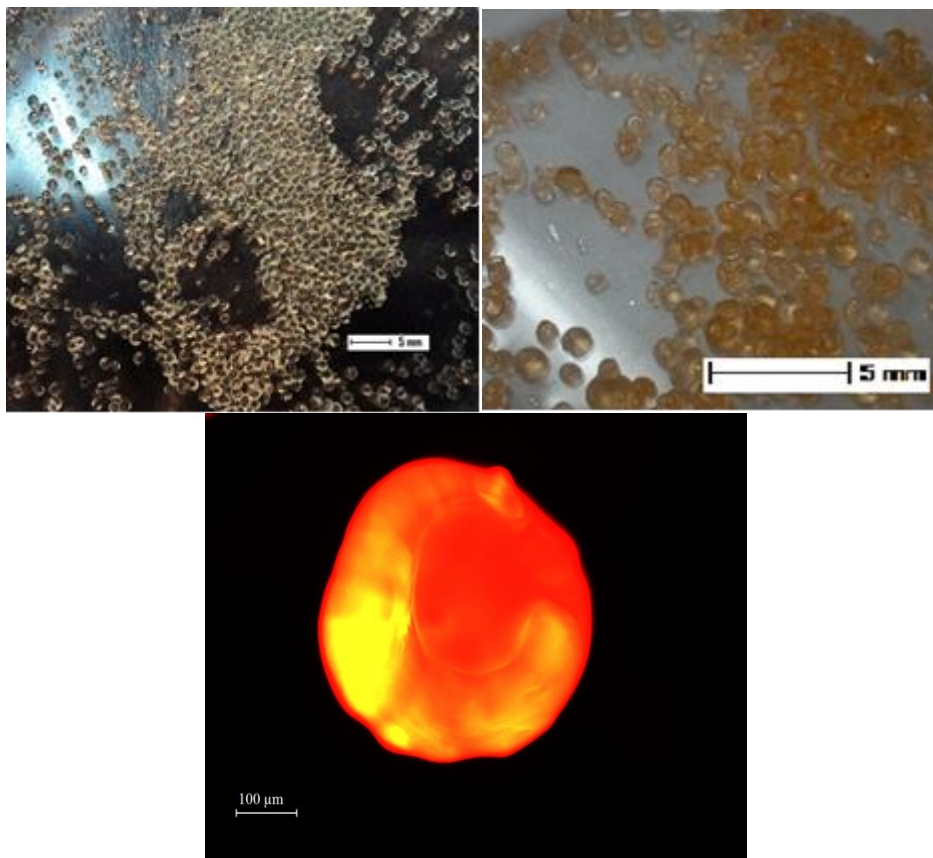
Para discriminar entre los distintos grados de metoxilación y conocer cual de las pectinas unía mas cantidad de Dox se procedió a realizar un tratamiento estadístico mediante el Test-t de Student (Anexo 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos no se encontraron diferencias significativas en la interacción entre las pectinas con diferentes grados de metoxilación y Dox.

3.3 Gelificación iónica de doxorubicina-pectinas:

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre las pectinas, se ensayaron las formulaciones de bajo y medio grado de metoxilación mediante la técnica de gelificación iónica. Las tres pectinas (PEC 33, PEC 35 y PEC 55) formaron esferas homogéneas en tamaño y forma y presentaron buena resistencia mecánica.

Figura 14: Microscopía óptica para partículas de PEC 55 con o sin carga de Dox (derecha e izquierda respectivamente) y de fluorescencia para una partícula cargada (abajo).



En base a los resultados obtenidos, sumados a datos preliminares de cinéticas de liberación (ver apartado de Ensayos de Liberación de Dox a partir de matrices de pectina), se decidió continuar los estudios con las matrices de PEC 35 y PEC 55.

3.4 Estudios reológicos

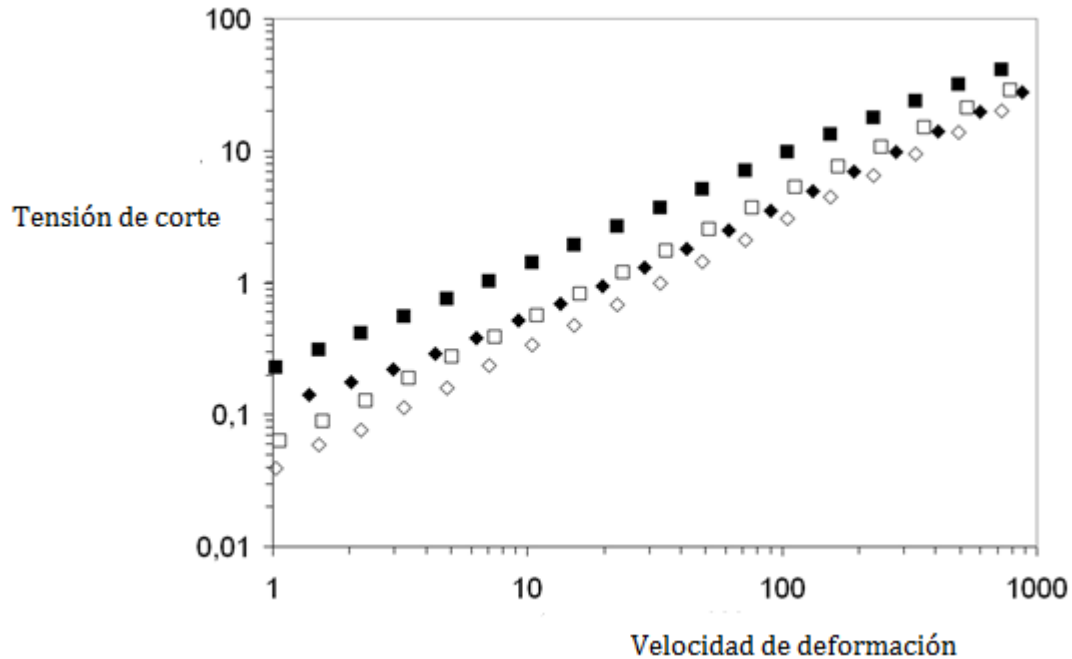
En una primera instancia se llevaron a cabo mediciones reológicas a diferentes temperaturas (10 y 20 °C) para los sistemas de PEC 35-Dox y PEC 55-Dox así como para cada una de las PEC puras. Una vez determinado el intervalo de trabajo se determinaron: la viscosidad y el esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación y en función del tiempo (aumentando la velocidad de deformación y disminuyéndola) para el estudio de tixotropía. Por otro lado, se realizaron estudios dinámicos de las muestras para analizar el comportamiento viscoelástico.

Se realizaron medidas de viscosidad aparente (Pa s), fuerza de corte (Pa) y velocidad de deformación (s^{-1}) para diferentes velocidades de agitación (rpm). La velocidad de deformación fue incrementada de 0 a $1000 s^{-1}$ en un período de 175 s para obtener la curva de ascenso, luego fue reducida desde 1000 hasta $0 s^{-1}$ para recoger datos de la curva descendente para el mismo periodo de tiempo y así estudiar la naturaleza de las muestras en su dependencia con el tiempo. Se detectó una leve tixotropía, que puede establecerse debido a una despreciable área entre las curvas. Esta observación es válida para las formulaciones ensayadas con droga, es decir: PEC 35-Dox y PEC 55-Dox, no así para las PEC sin la presencia de la droga. En la Figura 15 se ha representado el logaritmo natural de la fuerza de corte en función de la velocidad de deformación.

La viscosidad aparente se vio disminuida al incrementarse la velocidad de deformación e incrementada ante un aumento de la velocidad de deformación, indicando así un comportamiento pseudoplástico. La viscosidad aparente fue mayor para la pectina de menor grado de metoxilación de las ensayadas y se observó un aumento de por lo menos 5 veces para los sistemas conteniendo Dox. La PEC 55 presentó una menor resistencia al fluido de corte.

Figura 15. Comportamiento de flujo para PEC y PEC-Dox. Tensión de corte (Pa) en función de la velocidad de deformación ($1/s$).

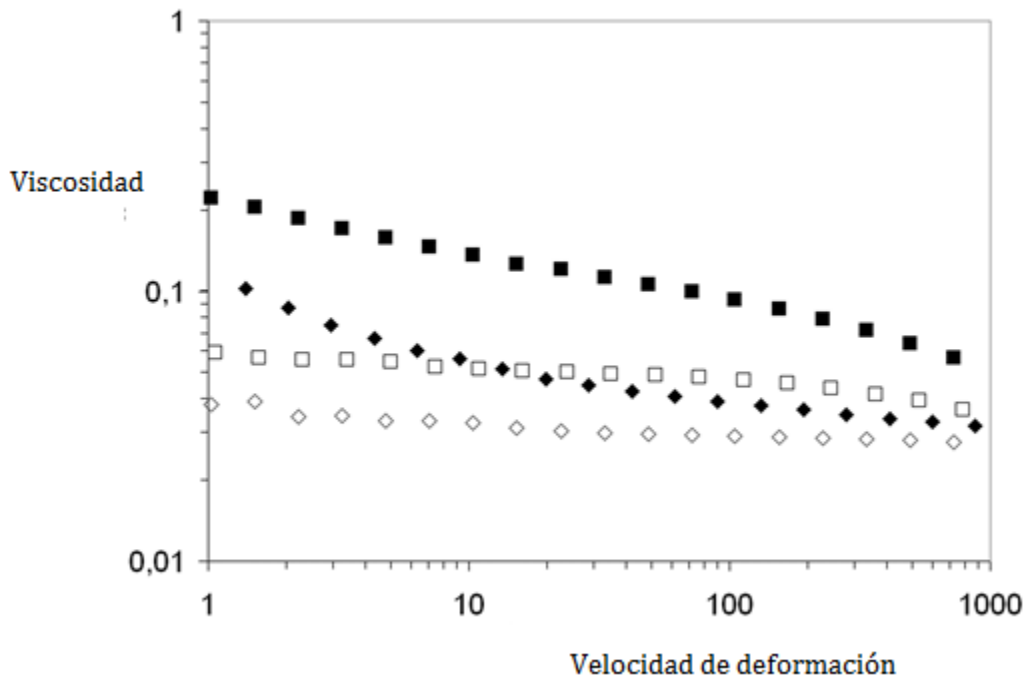
Símbolos: PEC 35 (\square); PEC 35-Dox (\blacksquare); PEC 55 (\diamond); PEC 55-Dox (\blacklozenge).



La PEC 55, con mayor grado de metoxilación, con y sin Dox exhibió una baja viscosidad de acuerdo a observaciones similares reportadas anteriormente [Fraeye y cols., 2009 y Bockki y cols., 2011]. La viscosidad aparente a 1 s^{-1} fue de aproximadamente 0.06 Pa s y 0.04 Pa s para la PEC 35 y la PEC 55 respectivamente, pero estos valores crecen hasta 0.22 Pa s para el sistema PEC 35-Dox y 0.102 Pa s para el sistema PEC 55-Dox, la cual se muestra en la Figura 6.

Figura 16. Comportamiento de flujo para PEC y PEC-Dox. Viscosidad aparente (Pa s) en función de la velocidad de deformación ($1/\text{s}$). Símbolos: PEC 35 (\square); PEC 35-Dox (\blacksquare); PEC 55

(◇); PEC 55-Dox (◆).



Modelo Reológico

Los datos experimentales obtenidos para las gráficas de esfuerzo de corte vs. velocidad de deformación fueron ajustados a la ley del modelo teórico seleccionado para determinar el coeficiente de consistencia (K) y el índice de flujo (n). La ecuación fundamental para este modelo es:

$$\tau = K (\dot{\gamma})^n$$

En donde τ es la fuerza de corte (Pa), $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación (s^{-1}), K es el índice de consistencia ($Pa \cdot s^n$) y n el índice para el comportamiento del flujo, cuyo valor es una medida del grado de comportamiento no-Newtoniano. Para fluidos pseudoplásticos, el índice de flujo n toma un valor entre 0 y 1 (para valores mas alejados de la unidad el comportamiento presentará pronunciadas propiedades no-Newtonianas)

Mediante el empleo de un análisis de regresión lineal en escala logarítmica se evaluaron K, n y el coeficiente de regresión (R) (Tabla 4). Como se puede observar el valor de n se encuentra lejos de la unidad por lo que los sistemas presentan un comportamiento de tipo pseudoplástico.

De los resultados de los análisis reológicos surge que la matriz de PEC 55 fue seleccionada para el encapsulamiento de Dox.

Tabla 4: Características reológicas de PEC 35 y PEC 55 con y sin Dox.

Sistemas	Índice de Flujo	Índice de consistencia K (Pa s)	R^2
PEC 35	0.939	0.060	0.9997
PEC 55	0.952	0.037	0.9998
PEC 35 - Dox	0.807	0.218	0.9997
PEC 55 - Dox	0.833	0.087	0.997

Los estudios reológicos del complejo de PEC 55-Dox permitieron establecer la existencia de interacciones matriz-Dox, así como el comportamiento del fluido del sistema.

3.5 Estudios vibracionales: Espectroscopía IR

Los análisis de FTIR confirmaron la presencia de la interacción entre PEC 55 y Dox (Tabla 5). Se encontró un desplazamiento del máximo característico para el grupo N-H de la Dox hacia valores mayores de frecuencia en presencia de la matriz (PEC 55): 1615 a 1628 cm^{-1} ($\Delta\nu = 13 \text{ cm}^{-1}$). Asimismo se encontró un desplazamiento para el máximo correspondiente al grupo carbonilo de Dox (a 1733 cm^{-1}), originalmente presente en 1722 cm^{-1} ($\Delta\nu = 11 \text{ cm}^{-1}$).

Además, el grupo carboxilo de la PEC 55 se desplazó desde 1609 hasta 1628 cm^{-1} ($\Delta\nu = 19 \text{ cm}^{-1}$). Las bandas asociadas a los grupos aromáticos de la

Dox presentes a 1743 cm^{-1} para el fármaco puro, se observaron a 1733 cm^{-1} ($\Delta\nu = 10\text{ cm}^{-1}$) en la formulación PEC 55-Dox, lo que sugiere una posible interacción generada entre las regiones hidrofóbicas de la pectina (carboxilatos de con medio y/o alto grado de metoxilación) y los grupos hidrofóbicos de la antraciclina mediada por los anillos aromáticos presentes en Dox. (Tabla 5).

El complejo de PEC 55-Dox muestra también un corrimiento hipsocrómico para el modo vibracional σ_{C-C} comparado con el espectro de Dox.

Los estudios de FTIR sugieren fuertemente una compleja interacción entre molécula cargo y su matriz. (Tabla 5) [Kayal y cols., 2010 y Purcell y cols., 1987].

Tabla 5: Bandas espectroscópicas encontradas en análisis FTIR (cm^{-1}) y sus asignaciones para: Dox pura, PEC 55 (en estado sólido) y la formulación PEC 55-Dox a pH= 7,4.

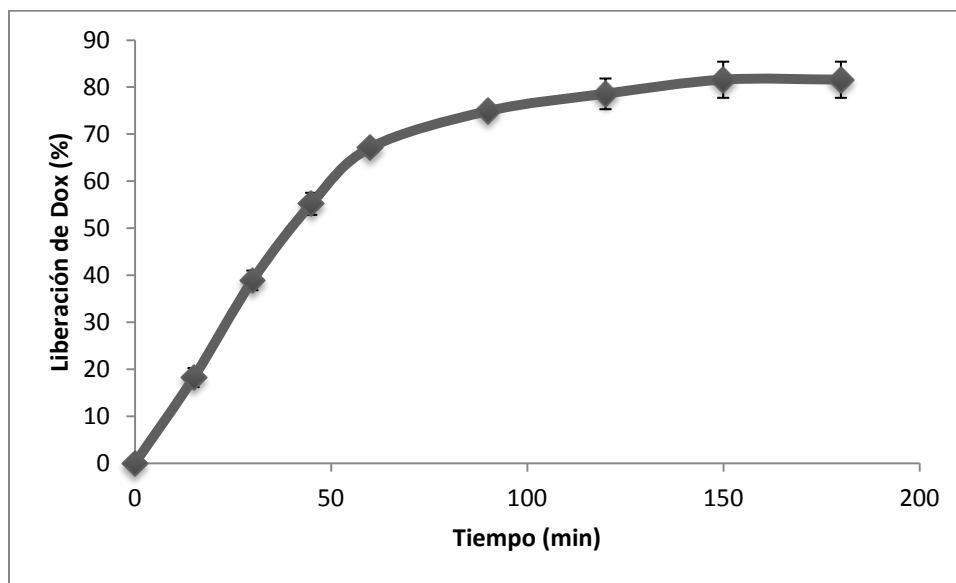
Longitudes de onda (cm^{-1})			$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Asignaciones
Dox	PEC	Formulación		
3389	-	3380	9	σ (N-H)
3330	-	3269	31	σ (H-O)
2932	2936	2929	4-3	σ (C-H)
1722	1743	1733	11-10	σ (C-C), ν (-COOCH₃)
1615	1609	1628	13-9	δ (N-H), ν (-COOH), ν ($\text{C}=\text{O}$) and phenyl breathing modes
1408	-	1459, 1443	~ 43	σ (C-C)
-	1328	1331	3	σ (C-O-C)
1077	1100	1099	23-1	σ (C-O)

Los estudios de espectroscopía de IR permitieron establecer algunas de las interacciones más intensas a nivel molecular entre la droga y la matriz las cuales correspondieron a los grupos carbonilo y a los anillos aromáticos de la Dox probablemente con las zonas hidrofóbicas de la pectina.

3.6 Ensayos de liberación

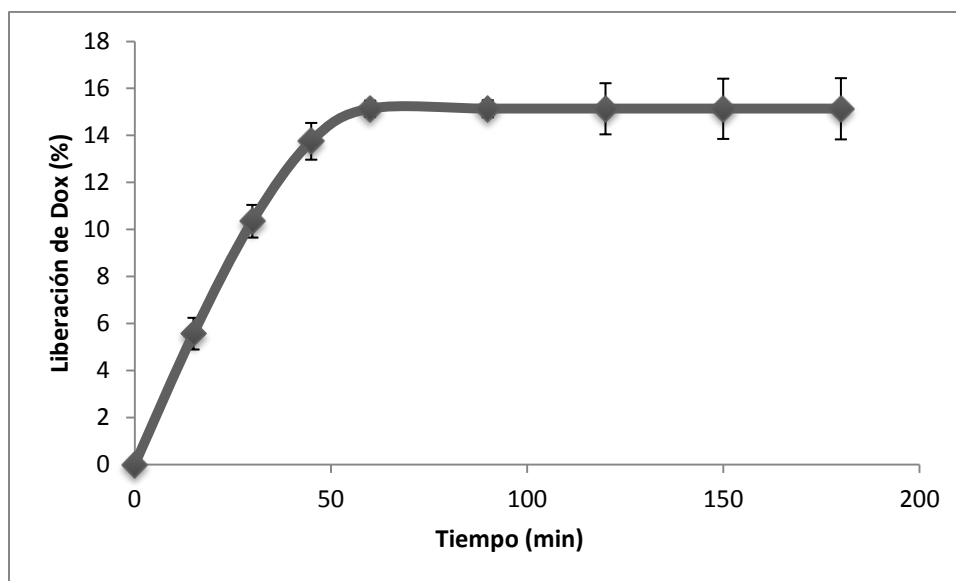
Los ensayos de liberación empleando las pectinas de bajo y medio grado de metoxilación (PEC 33, 35 y 55) seleccionadas en base a su capacidad de gelificación mostraron una tendencia que podría relacionarse con el grado de metoxilación. La PEC 55, comparada con las restantes, fue la que retuvo a la Dox en la matriz gelificada por más tiempo. Como puede observarse en las Figuras 15 y 16, la PEC 55 libera al medio de reacción aproximadamente un 15 % de la carga a la hora de incubación, mientras que la PEC 35 liberó casi el 70% de la carga inicial en el mismo tiempo. La PEC 33 fue descartada por presentar valores de liberación aún mayores (datos no mostrados).

Figura 17: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 en buffer HEPES pH = 7,4 a 25 °C.



El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ), el cual no supera el 11,1% de los valores mostrados.

Figura 18: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 55 en buffer HEPES pH = 7,4 a 25 °C.

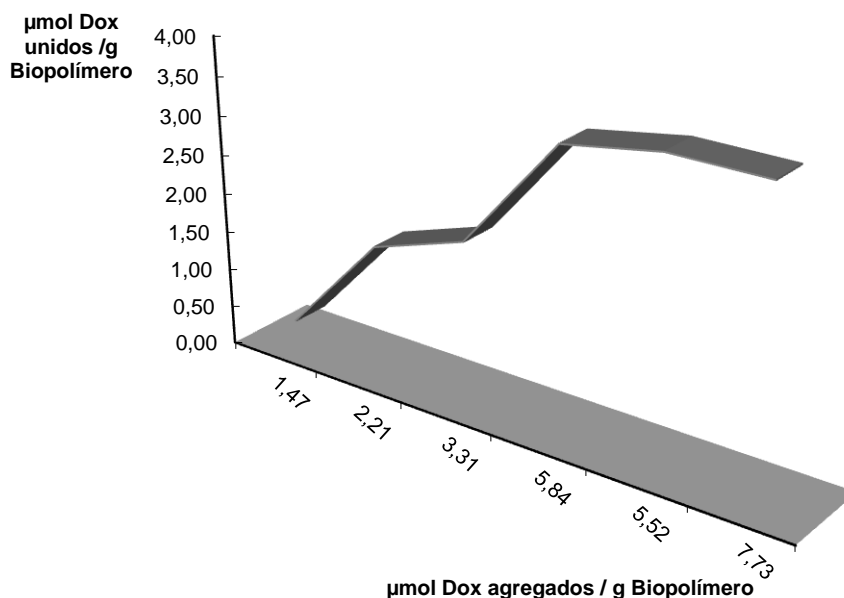


El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ), el cual no supera el 12,0% de los valores mostrados.

3.7 Capacidad de carga máxima de la PEC 55

Ensayos de carga máxima se llevaron a cabo para la PEC 55. Se obtuvo una concentración de saturación de Dox de 3,50 μ moles por gramo de biopolímero. La titulación de la droga en interacción con la matriz se esquematiza en la Figura 19.

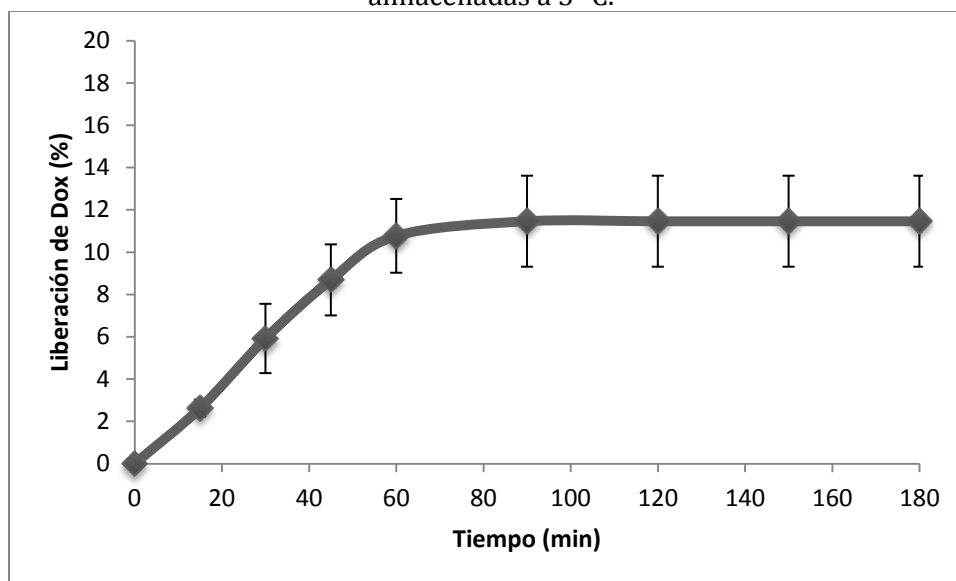
Figura 19: Carga máxima de la PEC 55 con Dox.



3.8 Estudios de almacenamiento y posterior liberación de Dox

Estudios de cinética de liberación fueron llevados a cabo con microesferas almacenadas a 5 °C durante 12 meses. Los resultados se muestran en la figura 20.

Figura 20: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 55 luego de 12 meses almacenadas a 5 °C.



El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación

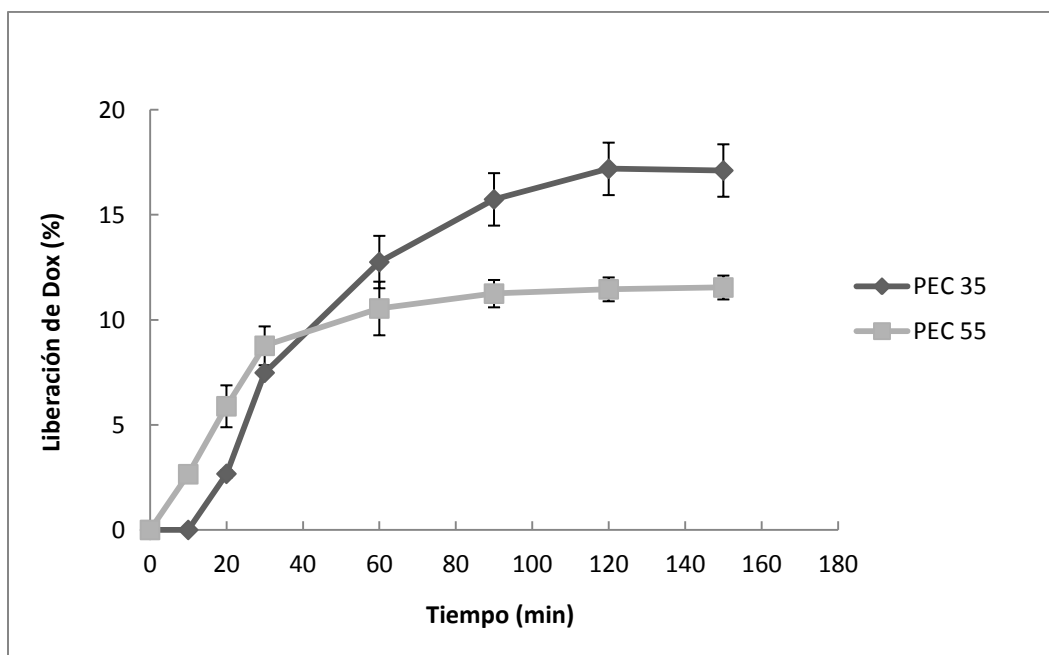
estándar (σ), el cual no supera el 27,6% de los valores mostrados.

La liberación de Dox a partir de las microesferas de PEC 55 almacenadas por un año a 5 °C fue de un 11 % a las 3 horas de incubación bajo las mismas condiciones experimentales que fueron ensayadas previamente. Este resultado indica la presencia de una estructura dinámica en la matriz, y el efecto positivo del proceso de maduración del gel.

3.9 Estudios de liberaciones en condiciones simuladas

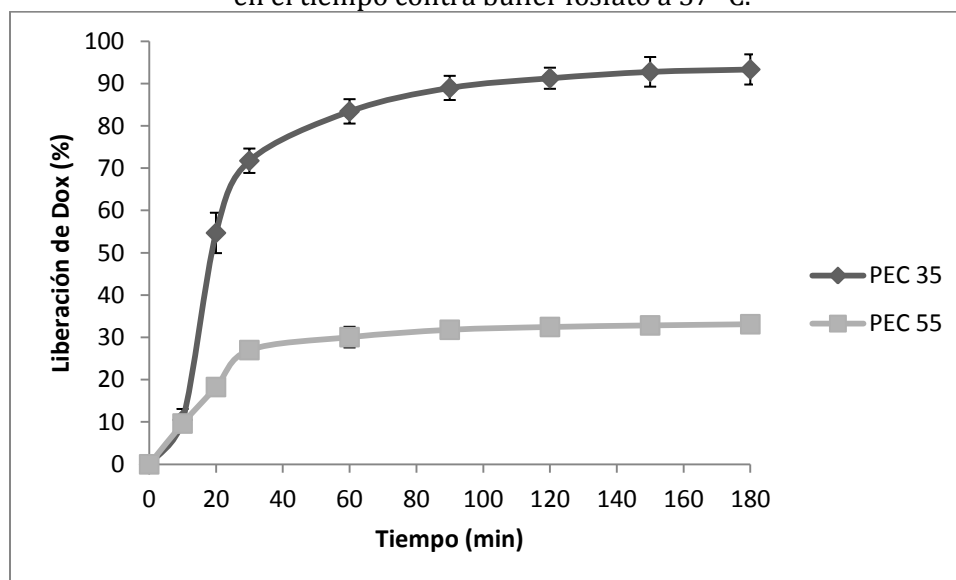
Debido a que PEC 55 fue la seleccionada como posible matriz para un transporte de Dox por vía oral se realizaron estudios de liberación bajo las condiciones simuladas del sistema gastrointestinal para la PEC 35 y PEC 55, ya que el cambio en las condiciones ambientales de liberación podría afectar a estos biopolímeros de manera diferente. Así, se compararon los comportamientos de ambas matrices en el proceso de liberación frente a un medio de simulación a pH estomacal (buffer Clark & Lubs, pH=2,0) (Figura 21), seguido de un medio alcalino para simulación de la porción intestinal del sistema digestivo (buffer fosfato pH= 7,4) (Figura 22). Puede observarse que en estas condiciones la PEC 55 alcanza un porcentaje de liberación de 33 %.

Figura 21: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 y PEC 55 en el tiempo contra buffer Clark and Lubs a 37 °C.



El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ), el cual no supera el 9,7% y 16,7% de los valores mostrados para las PEC 35 y PEC 55, respectivamente.

Figura 22: Cinética de liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 y PEC 55 en el tiempo contra buffer fosfato a 37 °C.

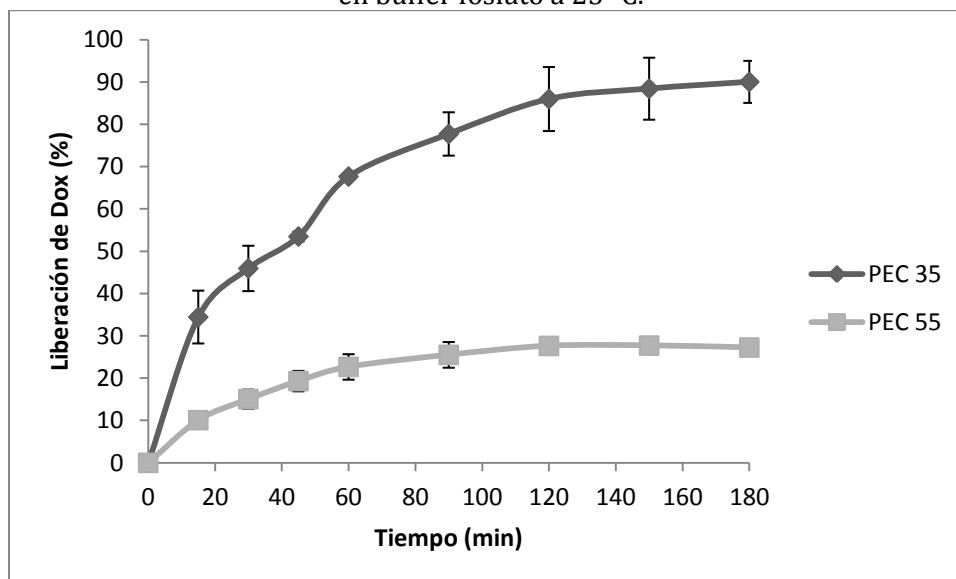


El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ), el cual no supera el 24,5% y 13,2% de los valores mostrados para las PEC 35 y PEC 55, respectivamente.

Por lo tanto, los resultados anteriores permiten confirmar la selección de la PEC 55 como matriz de encapsulamiento de Dox, debido a sus propiedades de conservar bajo las condiciones gastrointestinales simuladas, un porcentaje de carga de la droga apreciable (60 %) y presentar una liberación controlada de Dox para el tratamiento de tumores sólidos de colon.

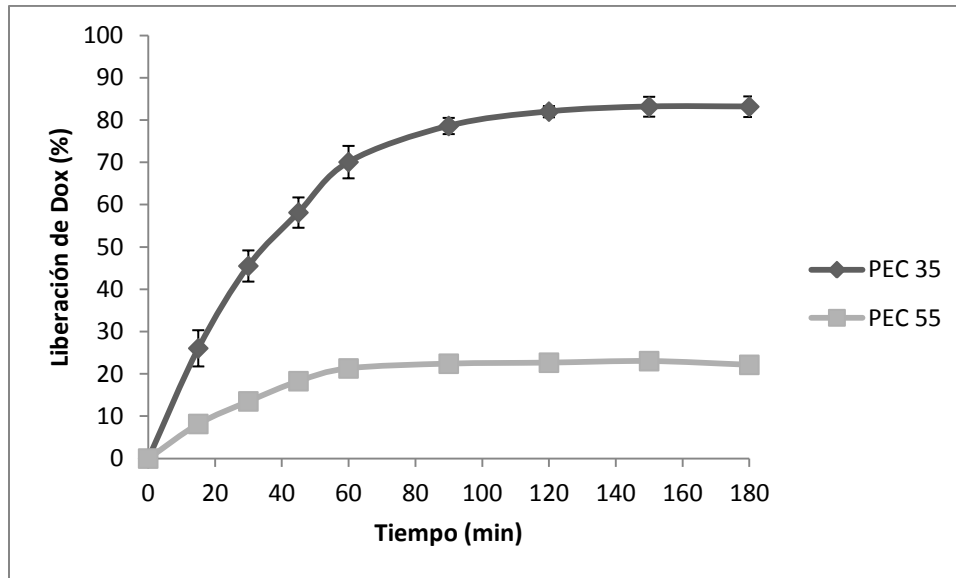
Además, se realizaron las pruebas de liberación de Dox desde las microesferas de PEC 55 en buffers a pH= 7,4 en HEPES y fosfato a 25 y 37 °C para comparar como afectan el buffer y la temperatura en la liberación.

Figura 23: Cinética de liberación de Dox de microesferas de PEC 35 y PEC 55 en buffer fosfato a 25 °C.



El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ), el cual no supera el 18,1% y 19,6% de los valores mostrados para las PEC 35 y PEC 55, respectivamente.

Figura 24: Cinética de liberación de Dox de microesferas de PEC 35 y PEC 55 en buffer HEPES a 37 °C.

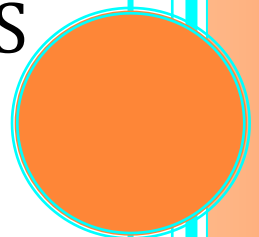


El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ), el cual no supera el 16,5% y 10,1% de los valores mostrados para las PEC 35 y PEC 55, respectivamente.

Analizando las figuras 17, 18 y 21 a 24 podemos ver que la liberación de Dox desde microesferas de PEC 35 y PEC 55 se ve afectada por el buffer y la temperatura. Se produce mayor de liberación de Dox en buffer fosfato y a 37 °C, pero se observa que es menor para la PEC 55.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES



De los estudios de selección de biopolímeros en presencia de Dox se obtuvo que la pectina, la carragenina y el alginato sean los biopolímeros que poseen mayor interacción con la droga.

De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionaron las pectinas como posibles matrices. Éstas presentaron una correlación inversa entre el grado de esterificación y su capacidad de gelificación iónica (en presencia de Ca^{+2}). Por ello, se siguió el estudio con las pectinas de bajo y medio grado de metoxilación: PEC 33, 35 y 55. Debido a los ensayos cinéticos se descartó la PEC 33.

La liberación de Dox encapsulada en microesferas de PEC 35 fue 5 veces más rápida comparada a la liberación producida desde microesferas formuladas con PEC 55. Esto sugiere que la liberación de moléculas con grupos hidrofóbicos se ve afectada por el efecto de la esterificación de los grupos carboxilo. Los estudios de espectroscopía de IR sugieren que los grupos de mayor unión entre ambas moléculas son los grupos carbonilo y los anillos aromáticos de la Dox con zonas hidrofóbicas de la pectina.

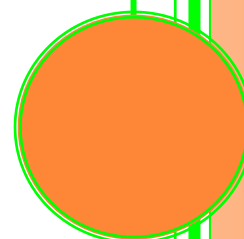
Por otro lado, la interacción hidrofóbica entre la PEC 55 y la Dox debiera ser mayor si se considera que posee un 20 % más de grupos metoxilo respecto de la PEC 35. Sin embargo, el grado de esterificación podría estar impactando negativamente sobre la estructura de las partículas producidas por gelación ionotrópica, reduciendo la estabilidad del gel. En nuestro caso, no se observaron diferencias entre ambos tipos de partículas en cuanto a la estabilidad del gel formado durante el tiempo de experimentación. Sin embargo, debería considerarse una solución de compromiso entre la gelación ionotrópica (concentración de iones Ca^{+2}) y el grado de esterificación de las pectinas para poder obtener microesferas con mayores capacidades de carga y a la vez una buena estabilidad.

Los resultados de las liberaciones de Dox desde microesferas de PEC 35 y 55 bajo condiciones simuladas del sistema gastrointestinal muestran que la PEC 35 libera mayor porcentaje de droga encapsulada en todas las condiciones ensayadas (distintos pHs y temperaturas).

Los estudios reológicos del complejo de PEC 55-Dox demostraron la existencia de interacciones matriz-Dox. Estas interacciones fueron confirmadas por los estudios espectroscópicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos los biogeles formados por PEC 55 serían excelentes candidatos para desarrollar una encapsulación de Dox en una matriz de hidrogel.

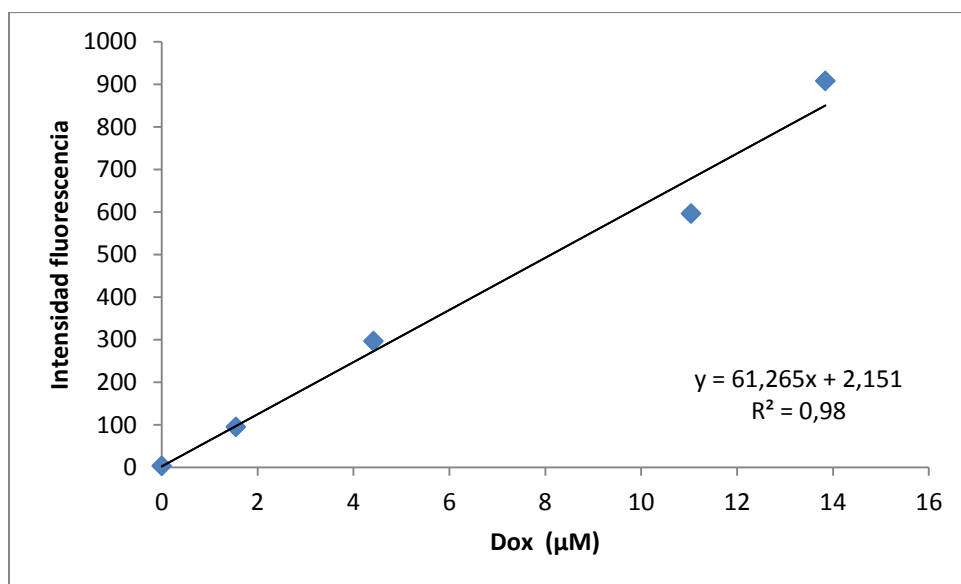
ANEXOS



ANEXO 1: Curvas de calibración

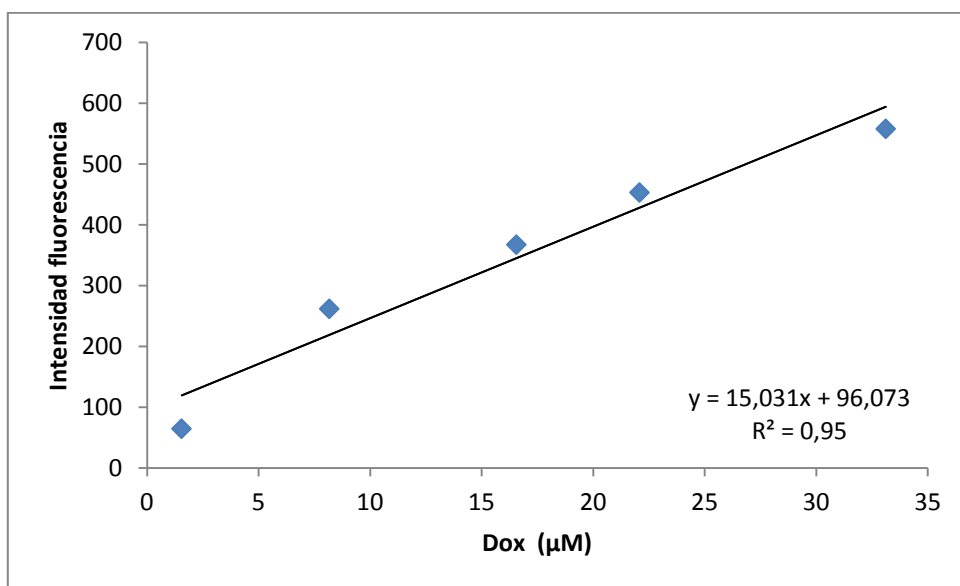
A1.1 Curva de calibración de Dox en acetona

[Dox] μM	Intensidad fluorescencia
0,0	$3,77 \pm 0,04$
1,55	$95,30 \pm 43,60$
4,42	$296,74 \pm 16,40$
11,04	$596,46 \pm 7,30$
13,84	$908,02 \pm 24,80$



A1.2 Curva de calibración de Dox en NaCl 0,9 % pH=3.0.

[Dox] μM	Intensidad fluorescencia
1,55	$64,76 \pm 0,70$
8,17	$261,89 \pm 6,00$
16,56	$367,39 \pm 1,30$
22,08	$453,18 \pm 53,60$
33,12	$557,85 \pm 7,20$



ANEXO 2: Test T para determinación de diferencias significativas entre muestras independientes.

Para discriminar entre los distintos grados de metoxilación y conocer cual de las pectinas poseía mayor interacción con Dox se procedió a realizar un tratamiento estadístico mediante el Test-t de Student:

Hipótesis:

- Hipótesis alterna (H_a)= las diferencias son significativas.
- Hipótesis nula (H_0)= las diferencias se deben al azar.

Nivel de significación:

Para todo valor de probabilidad igual o menor que 0,05 se acepta H_a y se rechaza H_0 (o sea $P \leq 0,05$).

Zona de rechazo:

Para todo valor de probabilidad mayor que 0,05 se acepta H_0 y se rechaza H_a ($P > 0,05$).

A2.1 Prueba entre PEC 33 y CAR

Tabla A2.1: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 33 (Muestra A) y CAR (Muestra B)

Muestra A	Muestra B		A	B	Total
1161.1 1134.3	582.3 714.8	n	2	2	4
		$\sum X$	2295.39999	1297.1	3592.49999
		$\sum X^2$	2634789.69	850012.329	3484802.02
		SS	359.12	8778.125	258287.967
		promedio	1147.7	648.55	898.125
		Prom _a —Prom _b		t	Grados de libertad
		499.15		+7.38	2

Donde:

$$SS = \sum (X - \text{promedio})^2$$

$$\sigma_p = \sqrt{[(SS_a + SS_b)/(n_a + n_b - 2)]}$$

$$t = (\text{Prom}_a - \text{Prom}_b) / (\sigma_p * \sqrt{(1/n_a) + (1/n_b)})$$

$$\text{Grados de libertad} = n_a + n_b - 2$$

Con el valor de “t” y los grados de libertad se va a una Tabla de la distribución t-Student para obtener el valor de probabilidad asignado (P).

$$P = 0,985$$

Se acepta H_a y rechaza H_0 con un nivel de confianza de aproximadamente 95%.

A2.2 Prueba entre PEC 35 y PEC 33

Tabla A2.2: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 35 (Muestra A) y PEC 33 (Muestra B)

Muestra A	Muestra B		A	B	Total
358.22 412.34	278.76 385.53	n	2	2	4
		$\sum X$	770.56	664.29	1434.85
		$\sum X^2$	298345.844	226340.518	524686.362
		SS	1464.4872	5699.9165	9987.7319
		promedio	385.28	332.145	358.7125
		Prom _a —Prom _b		t	Grados de libertad
		53.135		+0.89	2

P= 0,768

Se acepta Ho y rechaza Ha con un nivel de confianza de aproximadamente 95%.

A2.3 Prueba entre PEC 35 y PEC 55

Tabla A2.3: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 35 (Muestra A) y PEC 55 (Muestra B)

Muestra A	Muestra B		A	B	Total
358.22 412.34	415.06 344.97	n	2	2	4
		$\sum X$	770.56	760.03	1530.59
		$\sum X^2$	298345.844	291279.104	589624.948
		SS	1464.4872	2456.3041	3948.5115
		promedio	385.28	380.015	382.6475
		Prom _a —Prom _b		t	Grados de libertad
		5.265		+0.12	2

P= 0,535

Se acepta H_0 y rechaza H_a con un nivel de confianza de aproximadamente 95%.

A2.4 Prueba entre PEC 67 y PEC 55

Tabla A2.4: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 67 (Muestra A) y PEC 55 (Muestra B)

Muestra A	Muestra B		A	B	Total
464.84 375.94	415.06 344.97	n	2	2	4
		$\sum X$	840.78	760.03	1600.81
		$\sum X^2$	357407.109	291279.104	648686.213
		SS	3951.605	2456.3041	8038.0497
		promedio	420.39	380.015	400.2025
		Prom _a —Prom _b		t	Grados de libertad
		40.375		+0.71	2

P= 0,722

Se acepta H_0 y rechaza H_a con un nivel de confianza de aproximadamente 95%.

A2.5 Prueba entre PEC 74 y PEC 67

Tabla A2.5: Cálculo de los valores estadísticos del Test T para PEC 74 (Muestra A) y PEC 67 (Muestra B)

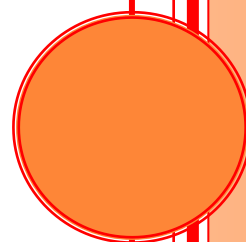
Muestra A	Muestra B		A	B	Total
447.23 538.64	464.84 375.94	n	2	2	4
		$\sum X$	985.87	840.78	1826.65
		$\sum X^2$	490147.722	357407.109	847554.831
		SS	4177.894	3951.605	13392.2761
		promedio	492.935	420.39	456.6625
		Prom _a —Prom _b		t	Grados de libertad
		72.545		+1.14	2

P= 0,815

Se acepta Ho y rechaza Ha con un nivel de confianza de aproximadamente 95%.

Por lo tanto, en los resultados se observa que no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grados de metoxilación en cuanto a las propiedades de interacción a Dox.

REFERENCIAS



- Berner-Strzelczyk A., Kołodziejska J. and Zgoda M. (2006). Application of guar gum biopolymer in the prescription of tablets with sodium ibuprofen--quality tests and pharmaceutical availability in vitro. PubMed 36:3-11.
- Bouhadir K. H., Alsberg E, Mooney D. J. (2001) Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents. Biomaterials, Vol. 22:2625-2633.
- Brannon-Peppas, L. (1997). Polymer in Controlled Drug Delivery. Medical Plastics and Biomaterials 4: 34-44.
- Cavalieri F., Chiessi E., Villa R., Vigan L., Zaffaroni N., Telling M. F. and Paradossi G. (2008) Novel PVA-based hydrogel microparticles for doxorubicin delivery. Biomacromolecules, 9: 1967–1973.
- Chavda, H.V., Patel, M.S., Patel, C.N. (2012). Preparation and in vitro evaluation of guar gum based triple-layer matrix tablet of diclofenac sodium. Res Pharm Sci. 7:57-64.
- Costas L., Bosio V.E. and col. (2008) Properties of immobilized Lipase on Pectin microspheres in organic solvents. Applied Biochemistry and Biotechnology 151:578–586.
- Costas L., Bosio V.E., Pandey A., Castro G.R. (2008). Stabilization of *Brevibacillus agri* 52 lipase activity in organic solvent mixtures and pectin gel encapsulation. American Society for Microbiology, 108th General Meeting, Boston, EE.UU.
- Dadsetan M., Liu Z., Pumberger M., Giraldo C.V., Ruesink T., Lul, Yaszemski M.J. (2010). A stimuli-responsive hydrogel for doxorubicin delivery. Biomaterials. 31:8051-8062.
- Dornish, M., Kaplan, D., Skaugrud, (2001). Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products. Ann. N. Y. Acad. Sci. 944: 388–397.
- Doroshov, J. H., Locker, G. Y. and Myers, C. E. (1980). Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. J Clin Invest. 65: 128–135.
- Doroshov, J. H. (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. Cancer Res 43: 460-472.
- Durand, D., Bertrand, C., Clark, A. H. and Lips A. (1990). Calcium-induced gelation of low-methoxy pectin solutions –thermodynamic and rheological considerations. Int. J. Biol. Macromol. 12: 14-18.

- Escobar J.L., García D.M., Zaldivar D. y Katime I. (2002) Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. Revista Iberoamericana Polímeros Volumen 3:1-25.
- Fraeye, I., Doungha, E., Duvetter, T., Moldenaers, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M., (2009). Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin–calcium gels. Food Hydrocolloids, 23: 2069–2077.
- Gajewski E., Gaur S., Akman S. A., Matsumoto L., van Balgooy L. N. A., Doroshov J. H. (2007). Oxidative DNA base damage in MCF-10A breast epithelial cells at clinically achievable concentrations of doxorubicin. Biochem Pharmacol. 73: 1947–1956.
- Husain N., Agbaria R.A., Warner I.M. (1993). Spectroscopic analysis of the binding of doxorubicin to human α -1 acid glycoprotein. Journal of Physical Chemistry, 97: 10857-10861.
- Karukstisu K.K., Thompson E.H.Z., Whiles J.A., Rosenfeld R.J. (1998). Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. Biophysical Chemistry 73: 249-263.
- Karunakar S., Wahi S.P. (1995) Preparation and in vitro characterization of metotrexate loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. International Federation of Pharmacy (FIP), Sweeden, 1995:138.
- Kayal S., & Ramanujan R.V. (2010) Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. Materials Science and Engineering C, 30: 484–490.
- Leroueil-Le Verger M., Fluckiger L., Kim Y.I., Hoffman M., Maicent P. (1998) Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. Eur J Pharm Biopharm; 56:197-208.
- Liechty W. B., Kryscio D. R., Slaughter B. V., Peppas N. A. (2010) Polymers for drug delivery systems. Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 1:149-173.
- Missirlis D. and col. (2006) Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. European journal of pharmaceutical sciences, vol 29(2):120–129.
- Neeves K. Controlled Release Drug Delivery from Hydrogels. Student's Guide. CSIP Graduate Fellow. Cornell University.
- Porto, S. (2003). Carragenina. Agargel. São Paulo - Brasil. Página Web: <http://www.agargel.com.br/carragenina.html>

- Purcell, J.M. & Fishman, M.L. (1987) Dissociation of dissolved pectins: Fourier – transform infrared spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 159: 185-190.
- Ruoslahti E., Sailor M.J. & Bhatia S.N. (2011) Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting. *Nature Materials*, 10:545–552.
- Sukukara Ch., Takahashi T., Hagiwara A. (1992). Controlled release of cisplatin from lactic acid oligomer microspheres incorporating cisplatin: in vitro studies. *J Controlled Release* 22(1):3-14.
- Susa M., Iyer A.I., Keinosuke Ryu K., Hornicek F.J., Mankin H., Amiji M.M. & Duan Z. (2009) Doxorubicin loaded polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma. *BMC Cancer*, 9:399.
- Tang X., Xie P., Ding Y., Chu L., Hou J., Yang J., Song X. and Xie Y. (2010) Synthesis, characterization and in vitro and in vivo evaluation of a novel pectin-adriamycin conjugate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:1599-1609.
- Teupe C., Meffert R., Winckler S., Ritzfeld W., Tormala P., Brug E. (1992) Ciprofloxacin impregnated poly L lactic acid drug carrier: new aspects of a resorbable drug delivery systems in local antimicrobial treatment of some infections. *Arch Orthop Trauma Surg*, 112:33-5.
- Tewey K. M., Rowe T.C., Yang L., Halligan B.D., Liu L.F. (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*; 226:466–8.
- Xu X., Persson H.L. and Richardson D.R. (2005) Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Molecular Pharmacology*, 68: 261-271.